

553,509

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 10 月 28 日 (28.10.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/092385 A1

(51) 国際特許分類⁷: C12N 15/12, C12Q
1/68, G01N 21/78, 33/53, 33/566, 33/58

Mitsuharu) [JP/JP]; 〒6018045 京都府京都市南区東九条西明田町 5 7 番地 アークレイ株式会社内 Kyoto (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/005525

(74) 代理人: 川口 嘉之, 外(KAWAGUCHI, Yoshiyuki et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋 3 丁目 4 番 10 号 アクロポリス 21 ビル 6 階 Tokyo (JP).

(22) 国際出願日: 2004 年 4 月 16 日 (16.04.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2003-114381 2003 年 4 月 18 日 (18.04.2003) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): アークレイ株式会社 (ARKRAY, INC.) [JP/JP]; 〒6018045 京都府京都市南区東九条西明田町 5 7 番地 Kyoto (JP).

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG,

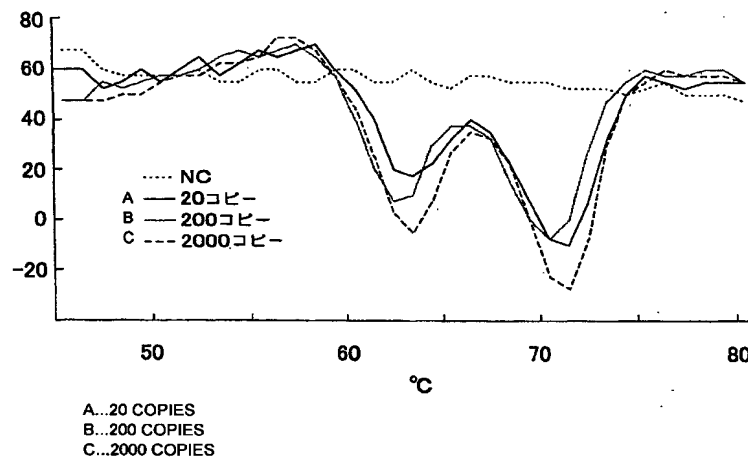
(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 平井 光春 (HIRAI,

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF DETECTING β 3 ADRENALINE RECEPTOR MUTANT GENE AND NUCLEIC ACID PROBE AND KIT THEREFOR

(54) 発明の名称: β 3 アドレナリン受容体変異遺伝子の検出法ならびにそのための核酸プローブおよびキット



(57) Abstract: A nucleic acid probe in which a region containing a mutation in a base sequence bringing about a mutation of substituting tryptophan at the 64-position of the amino acid sequence of β 3 adrenaline receptor into arginine (B3AR Trp64Arg mutation) is amplified by PCR and one end is labeled with a fluorescent dye and which shows a decrease in the fluorescence of the fluorescent dye upon hybridization. This probe has a base sequence starting with the base at the 183-position in the base sequence represented by SEQ ID NO:1, consisting of 8 to 30 bases and being labeled at the 5' -end with a fluorescent dye, or a base sequence ending with the base at the 196-position in the base sequence represented by SEQ ID NO:2, consisting of 7 to 30 bases and being labeled at the 3' -end with a fluorescent dye. Using this nucleic acid probe, the fluorescence of the fluorescent dye is measured to conduct melting curve analysis. Based on the results of the melting curve analysis, a mutation is detected.

[続葉有]

WO 2004/092385 A1



KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(57) 要約:

β 、アドレナリン受容体のアミノ酸配列の64位のトリプトファンがアルギニンに置換する変異をもたらす塩基配列の変異 (B3AR Trp64Arg変異) を含む領域をPCRで増幅し、末端が蛍光色素で標識され、ハイブリダイゼーションしたときに蛍光色素の蛍光が減少する核酸プローブであって、配列番号1に示す塩基配列において塩基番号183から始まる8～30塩基長の塩基配列を有し、5'末端が蛍光色素で標識され、または、配列番号2に示す塩基配列において塩基番号196で終わる7～30塩基長の塩基配列を有し、3'末端が蛍光色素で標識されている核酸プローブを用いて、蛍光色素の蛍光を測定することにより融解曲線分析を行い、融解曲線分析の結果に基づいて変異を検出する。

明細書

β 3 アドレナリン受容体変異遺伝子の検出法ならびにそのための核酸プローブおよびキット

技術分野

本発明は、 β 3 アドレナリン受容体変異遺伝子の検出法およびそのためのキットに関する。

背景技術

β 3 アドレナリン受容体 (B3AR) は白色脂肪細胞における脂肪分解と褐色脂肪細胞における熱生産に大きな役割を果たしている。このB3ARのアミノ酸配列の64位のトリプトファンがアルギニンに置換している変異 (Trp64Arg) が存在すると安静時の代謝量が200kcal低下するといわれており、この変異と内蔵脂肪型肥満、インスリン抵抗性が関連しているといわれている。

B3ARにTrp64Arg変異をもたらす塩基の変異 (以下、「B3AR Trp64Arg変異」ともいう) が存在するとその部分に制限酵素の認識部位が出現するため、PCRで変異部分を含むように増幅を行い、制限酵素で切断し、その後電気泳動で切断されたかどうかを検出するという方法 (PCR-RFLP) で検出を行うことが知られている。

PCRは数分子の鋳型から数10億倍もの分子を増幅するため、増幅産物がほんの少し混入した場合でも偽陽性、偽陰性の原因になり得る。PCR-RFLPはPCR反応後に増幅産物を取り出して制限酵素処理を行うという必要があるため、増幅産物が次の反応系に混入する恐れがある。よって、偽陽性、偽陰性の結果が得られてしまうことがある。さらに、PCR終了後、制限酵素で処理を行い、その後電気泳動を行うため、検出に必要な時間も非常に長くかかってしまう。また、操作が複雑なため、自動化が困難である。

一方、一般に、変異を含む領域をPCRで増幅した後、蛍光色素で標識された核酸プローブを用いて融解曲線分析を行い、融解曲線分析の結果に基づいて変異を解析する方法が知られている (クリニカルケミストリー (Clinical Chemistry)、

2000年、第46巻、第5号、p. 631-635、特開2002-119291号公報）。

発明の開示

本発明の課題は、B3AR Trp64Arg変異を検出するのに有効な消光プローブを特定し、B3AR Trp64Arg変異を検出する方法及びそのためのキットを提供することを課題とする。

上述のプローブを用いる方法に関する文献においては、プローブの設計に関し、末端部が蛍光色素により標識された消光プローブが標的核酸にハイブリダイゼーションしたとき、末端部分においてプローブ-核酸ハイブリッドの複数塩基対が少なくとも一つのGとCのペアを形成するように設計するという教示があるのみである。本発明者らは、B3AR Trp64Arg変異に関し、上記条件を満たす消光プローブを設計し、検出を試みたが、容易に検出を可能とする消光プローブは得られなかった。

本発明者らは、B3AR Trp64Arg変異を含む特定の領域に基づいて消光プローブを設計することにより、消光プローブを用いる融解曲線分析によりB3AR Trp64Arg変異を検出できることを見出し、本発明を完成した。

本発明は、以下のものを提供する。

(1) 末端が蛍光色素で標識され、ハイブリダイゼーションしたときに蛍光色素の蛍光が減少する核酸プローブであって、配列番号1に示す塩基配列において塩基番号183から始まる8～30塩基長の塩基配列を有し、5'末端が蛍光色素で標識され、または、配列番号2に示す塩基配列において塩基番号196で終わる7～30塩基長の塩基配列を有し、3'末端が蛍光色素で標識されている前記核酸プローブ。

(2) 核酸プローブが、配列番号8～12に示す塩基配列のいずれかを有する(1)の核酸プローブ。

(3) 一塩基多型の部位を有する核酸について、蛍光色素で標識された核酸プローブを用いて、蛍光色素の蛍光を測定することにより融解曲線分析を行い、融解曲線分析の結果に基づいて変異を検出する方法であって、一塩基多型は、 β 。

アドレナリン受容体をコードする核酸における、 β_3 アドレナリン受容体のアミノ酸配列の64位のトリプトファンがアルギニンに置換する変異をもたらす塩基配列の変異であり、核酸プローブは、(1)または(2)の核酸プローブである前記方法。

(4) 試料に含まれる核酸における一塩基多型の部位を含む領域を増幅して一塩基多型を有する核酸を得ることを含む(3)の方法。

(5) 増幅をDNAポリメラーゼを用いる方法により行う(4)の方法。

(6) 増幅を核酸プローブの存在下で行う(5)の方法。

(7) 末端が蛍光色素で標識され、ハイブリダイゼーションしたときに蛍光色素の蛍光が減少する核酸プローブであって、配列番号1に示す塩基配列において塩基番号183から始まる8~30塩基長の塩基配列を有し、5'末端が蛍光色素で標識され、または、配列番号2に示す塩基配列において塩基番号196で終わる7~30塩基長の塩基配列を有し、3'末端が蛍光色素で標識されている前記核酸プローブを含む、(3)の方法のためのキット。

(8) 核酸プローブが、配列番号8~12に示す塩基配列のいずれかを有する(7)のキット。

(9) β_3 アドレナリン受容体をコードする核酸における、 β_3 アドレナリン受容体のアミノ酸配列の64位のトリプトファンがアルギニンに置換する変異をもたらす塩基配列の変異を含む領域を、DNAポリメラーゼを用いる方法で増幅するためのプライマーをさらに含む(7)または(8)のキット。

図面の簡単な説明

図1は、変異の識別不可能な消光プローブの位置を示す。

図2は、変異の識別可能な消光プローブの位置を示す。

図3は、実施例1の方法(プローブ5FL-wt-1-16使用)のゲノムDNAの絶対量に関する感度を示す。

図4は、実施例1の方法(プローブ5FL-wt-1-16使用)の再現性を示す。

図5は、実施例1の方法(プローブ3T-mt-2-20使用)のゲノムDNAの絶対量に関する感度を示す。

図6は、実施例1の方法(プローブ3T-mt-2-20使用)の再現性を示す。

発明を実施するための最良の形態

<1>本発明プローブ及び本発明検出方法

本発明プローブは、末端が蛍光色素で標識され、ハイブリダイゼーションしたときに蛍光色素の蛍光が減少する核酸プローブであって、配列番号1に示す塩基配列において塩基番号183から始まる8～30塩基長の塩基配列を有し、5'末端が蛍光色素で標識され、または、配列番号2に示す塩基配列において塩基番号196で終わる7～30塩基長の塩基配列を有し、3'末端が蛍光色素で標識されていることを特徴とする。

本発明プローブは、配列番号1に示す塩基配列(B3AR Trp64Arg変異における野生型の塩基を有する配列)において塩基番号183から始まる8～30塩基長の塩基配列または配列番号2に示す塩基配列(B3AR Trp64Arg変異における変異型の塩基を有する配列)において塩基番号196で終わる7～30塩基長の塩基配列を有する他は、特許文献1に記載された消光プローブと同様でよい。本発明に使用される消光プローブの塩基配列の例としては、配列番号8～12に示すものが挙げられる。蛍光色素としては、特許文献1に記載されたものが使用できるが、具体例としては、FAM(商標)、TAMRA(商標)、BODIPY(商標) FL等が挙げられる。蛍光色素のオリゴヌクレオチドへの結合方法は、通常の方法、例えば特許文献1に記載の方法に従って行うことができる。

本発明検出方法は、一塩基多型の部位を有する核酸について、蛍光色素で標識された核酸プローブを用いて、蛍光色素の蛍光を測定することにより融解曲線分析を行い、融解曲線分析の結果に基づいて変異を検出する方法であって、一塩基多型は、B3AR Trp64Arg変異であり、核酸プローブは本発明プローブであることを特徴とする。

本発明検出方法は、B3ARをコードするDNAのB3AR Trp64Arg変異を含む領域を増幅すること、及び、本発明プローブを用いることの他は、通常の方法、例えば融解曲線分析(T_m解析)の方法に従って行うことができる。

核酸増幅の方法としては、ポリメラーゼを用いる方法が好ましく、その例とし

ては、PCR、ICAN、LAMP等が挙げられる。ポリメラーゼを用いる方法により増幅する場合は、本発明プローブの存在下で増幅を行うことが好ましい。用いるプローブに応じて、増幅の反応条件等を調整することは当業者であれば容易である。これにより、核酸の増幅後にプローブの T_m を解析するだけなので、反応終了後増幅産物を取り扱う必要がない。よって、増幅産物による汚染の心配がない。また、増幅に必要な機器と同じ機器で検出することが可能なので、容器を移動する必要はない。よって、自動化も容易である。

以下、PCRを用いる場合を例として、さらに説明する。PCRに用いるプライマー対は、本発明プローブがハイブリダイゼーションできる領域が増幅されるようにする他は、通常のPCRにおけるプライマー対の設定方法と同様にして設定することができる。プライマーの長さ及び T_m は、通常には、10mer～40merで40～70℃、好ましくは15mer～25merで55～60℃である。プライマー対の各プライマーの長さは同一でなくてもよいが、両プライマーの T_m はほぼ同一（通常には、相違が2℃以内）であることが好ましい。なお、 T_m 値は最近接塩基対(Nearest Neighbor)法により算出した値である。プライマー対の例としては、配列番号2及び3に示す塩基配列を有するプライマーからなるものが挙げられる。

PCRは、本発明で使用する本発明プローブの存在下で行うことが好ましい。これにより、増幅反応終了後に増幅産物を取り扱う操作を行うことなく T_m 解析を行うことができる。用いるプローブに応じて、プライマーの T_m やPCRの反応条件を調整することは当業者であれば容易である。

代表的なPCR反応液の組成を挙げれば、以下の通りである。

表 1

| | |
|-----------------------|------------------------|
| DNA断片 | $10^1 \sim 10^8$ 分子／反応 |
| プライマー | 200～1000M |
| プローブ | 100～1000 n M |
| ヌクレオチド | 各20～200 μ M |
| DNAポリメラーゼ | 0.01～0.03単位／ μ l |
| Tris-HCl (pH 8.4～9.0) | 5～20mM |
| MgCl ₂ | 1.5～3mM |
| KCl | 10～100mM |
| グリセロール | 0～20% |
| (最終液量：10～100 μ l) | |

また、代表的な温度サイクルを挙げれば、以下の通りであり、この温度サイクルを通常25～40回繰り返す。

- (1) 変性、90～98℃、1～60秒
- (2) アニールリング、60～70℃、10～60秒
- (3) 伸長、60～75℃、10～180秒

アニールリング及び伸長を一ステップで行う場合には、60～70℃、10～180秒の条件が挙げられる。

T_m解析は、本発明プローブの蛍光色素の蛍光を測定する他は通常の方法に従って行うことができる。蛍光の測定は、蛍光色素に応じた波長の励起光を用い発光波長の光を測定することに行うことができる。T_m解析における昇温速度は、通常には、0.1～1℃／秒である。T_m解析を行うときの反応液の組成は、プローブとその塩基配列に相補的な配列を有する核酸とのハイブリダイゼーションが可能であれば特に制限されないが、通常には、一価の陽イオン濃度が1.5～5 mM、pHが7～9である。PCR等のDNAポリメラーゼを用いる増幅方法の反応液は、通常、この条件を満たすので、増幅後の反応液をそのままT_m解析に用いることができる。

T_m解析の結果に基づくB3AR Trp64Arg変異の検出は通常の方法に従って行うことができる。本発明における検出とは、変異の有無の検出の他、変異型DNAの定量、野生型DNAと変異型DNAの割合の測定も包含する。

< 2 > 本発明キット

本発明キットは、本発明の検出方法に用いるためのキットである。このキットは、末端が蛍光色素で標識され、ハイブリダイゼーションしたときに蛍光色素の蛍光が減少する核酸プローブ（消光プローブ）であって、配列番号 1 に示す塩基配列において塩基番号 183 から始まる 8～30 塩基長の塩基配列を有し、5' 末端が蛍光色素で標識され、または、配列番号 2 に示す塩基配列において塩基番号 196 で終わる 7～30 塩基長の塩基配列を有し、3' 末端が蛍光色素で標識されている核酸プローブを含むことを特徴とする。

消光プローブについては、本発明プローブに関し、上記に説明した通りである。

本発明検出キットは、消光プローブの他に、本発明の検出方法における核酸増幅を行うのに必要とされる試薬類、特に DNA ポリメラーゼを用いる増幅のためのプライマーをさらに含んでもよい。

本発明検出キットにおいて消光プローブ、プライマー及びその他の試薬類は、別個に収容されていてもよいし、それらの一部が混合物とされていてもよい。

実施例

以下に、本発明を実施例により具体的に説明する。

実施例 1

ヒト B3AR 遺伝子の Trp64Arg 変異の部位を含む塩基配列（配列番号 1）に基づき、Trp64Arg 変異を含む部分を増幅できるように表 2 に示すプライマーを設計した。表 2 中、位置は、配列番号 1 に示す塩基配列における塩基番号を示す。

表 2

プライマー

| 名称 | 配列 (5' → 3') | mer | 位置 | 配列番号 |
|----|----------------------|-----|---------|------|
| R | gccagcgaagtcacgaacac | 20 | 239-220 | 3 |
| F | ggcgctggcggtgc | 14 | 132-145 | 4 |

次に、表 3 に示す、末端部にCを有するプローブを設計した。表 3 中、位置は、配列番号 1 に示す塩基配列における塩基番号を示す。また、塩基配列中の大文字は、B3AR Trp64Arg変異の部位を示し、3' 末端の(P)は、リン酸化されていることを示す。BODIPY (商標) FL又はTAMRA (商標) による標識は、常法に従って行った。

表 3

プローブ

| 名称 | 配列 (5' → 3') | mer | 位置 | 配列番号 |
|-------------|--------------------------------------|-----|---------|------|
| 5FL-mt-4-16 | (BODIPY FL)-ccatcgccCggactcc-(P) | 16 | 182-197 | 5 |
| 3T-mt-4-16 | ccatcgccCggactcc-(TAMRA) | 16 | 182-197 | 5 |
| 5FL-mt-4-19 | (BODIPY FL)-ccatcgccCggactccgag-(P) | 19 | 182-200 | 6 |
| 3T-mt-3-19 | gtcatcggtggccatcgccC-(TAMRA) | 19 | 172-190 | 7 |
| 3T-mt-2-20 | cgtggccatcgccCggactc-(TAMRA) | 20 | 177-196 | 8 |
| 5FL-wt-1-20 | (BODIPY FL)-catcgccTggactccgagac-(P) | 20 | 183-202 | 9 |
| 5FL-wt-1-18 | (BODIPY FL)-catcgccTggactccgag-(P) | 18 | 183-200 | 10 |
| 5FL-wt-1-16 | (BODIPY FL)-catcgccTggactccg-(P) | 16 | 183-198 | 11 |
| 5FL-wt-1-15 | (BODIPY FL)-catcgccTggactcc-(P) | 15 | 183-197 | 12 |

ゲノムDNAをサンプルとして、Smart Cycler System (Cephied)を用い、以下の条件でPCR及びT_m解析を行った。T_m解析における励起波長及び検出波長は、それぞれ450～495 nm及び505～537 nm (BODIPY FL)、527～555 nm及び565～605 nm (TAMRA) であった。

表 4

反応液組成

| | |
|------------------------------|---------------|
| H ₂ O | 13.2 μ L |
| 10 \times Gene Taqバッファー | 2.5 μ L |
| 80% グリセロール | 6.25 μ L |
| 各10mM dATP, dUTP, dGTP, dCTP | 0.5 μ L |
| 2U/ μ L ウラシル-N-グリコシラーゼ | 0.05 μ L |
| 5 μ M プローブ | 1 μ L |
| 100 μ M プライマーF | 0.125 μ L |
| 100 μ M プライマーR | 0.25 μ L |
| 5U/ μ L Gene Taq | 0.125 μ L |
| サンプル (0~2000コピー) | 1 μ L |
| 合計 | 25 μ L |

表 5

反応条件

50°C, 2min

↓

95°C, 2min

↓

95°C, 1sec

66°C, 18sec (50cycles)

↓

T_m解析 (1°C/sec)

各プローブを用いてPCR及びT_m解析を行った結果、プローブ3T-mt-2-20、5FL-wt-1-20、5FL-wt-1-18、5FL-wt-1-16及び5FL-wt-1-15を用いたときのみ、T_m解析で解析の可能な蛍光強度の変化が認められた。なお、各プローブのB3AR Trp64Arg変異を含む塩基配列に対する配置を図1及び2に示す。図中、野生型配列及び変異型配列は、それぞれ配列番号1及び2の塩基配列の塩基番号171~205である。また、図中、Fは蛍光色素を示す。図1及び2に示す配置からみて、プローブがT_m解析で利用できるかどうかは、蛍光色素を結合させたCの位置に依存すると考えられ、プローブの長さは、多型部位を含む限り、あまり重要でないと考えられる。

以下、プローブ5FL-wt-1-16を用いて、ゲノムDNAの絶対量に関する感度、及び、再現性を検討した。

ゲノムDNA（野生型）をそれぞれ、0、20、200及び2000コピー含むサンプルを用いて、上記の方法を繰り返した。結果を図3に示す。図3から明らかなように、20コピーであっても検出可能であることが示された。

次に、野生型ゲノムDNAとこの変異型ゲノムDNAとを等量含むサンプル(wt/mt)、野生型ゲノムDNAのみのサンプル(wt/wt)及び変異型ゲノムDNAのみのサンプル(mt/mt)を用いて、上記の方法を繰り返した。結果を図4に示す。図4から明らかなように、本方法は再現性に優れることが示された。

さらに、プローブ5FL-wt-1-16の代わりにプローブ3T-mt-2-20を用いて同様にゲノムDNAの絶対量に関する感度、及び、再現性を検討した。結果を図5及び6に示す。図5及び6から明らかなように、高感度で再現性に優れることが示された。

なお、図3～6において縦軸は、蛍光強度の一次導関数の逆符号の値（ $-dF/dt$ ）、横軸は温度（℃）である。

産業上の利用の可能性

本発明によれば、B3AR Trp64Arg変異を検出するのに有効な消光プローブが提供され、さらに、それを用いるB3AR Trp64Arg変異を検出する方法及びそのためのキットが提供される。T_m解析は数十秒で完了するため、検出に必要な時間が大幅に短略化出来る。プローブの存在下での核酸の増幅とT_m解析を組み合わせる本発明の好ましい態様によれば、核酸の増幅後にプローブのT_mを解析するだけなので、反応終了後増幅産物を取り扱う必要がない。よって、増幅産物による汚染の心配がない。また、さらに、増幅に必要な機器と同じ機器で検出することが可能なので、容器を移動する必要すらない。よって、自動化も容易である。

請求の範囲

1. 末端が蛍光色素で標識され、ハイブリダイゼーションしたときに蛍光色素の蛍光が減少する核酸プローブであって、配列番号1に示す塩基配列において塩基番号183から始まる8～30塩基長の塩基配列を有し、5'末端が蛍光色素で標識され、または、配列番号2に示す塩基配列において塩基番号196で終わる7～30塩基長の塩基配列を有し、3'末端が蛍光色素で標識されている前記核酸プローブ。
2. 核酸プローブが、配列番号8～12に示す塩基配列のいずれかを有する請求項1記載の核酸プローブ。
3. 一塩基多型の部位を有する核酸について、蛍光色素で標識された核酸プローブを用いて、蛍光色素の蛍光を測定することにより融解曲線分析を行い、融解曲線分析の結果に基づいて変異を検出する方法であって、一塩基多型は、 β_3 アドレナリン受容体をコードする核酸における、 β_3 アドレナリン受容体のアミノ酸配列の64位のトリプトファンがアルギニンに置換する変異をもたらす塩基配列の変異であり、核酸プローブは、請求項1または2に記載の核酸プローブである前記方法。
4. 試料に含まれる核酸における一塩基多型の部位を含む領域を増幅して一塩基多型を有する核酸を得ることを含む請求項3記載の方法。
5. 増幅をDNAポリメラーゼを用いる方法により行う請求項4記載の方法。
6. 増幅を核酸プローブの存在下で行う請求項5記載の方法。
7. 末端が蛍光色素で標識され、ハイブリダイゼーションしたときに蛍光色素の蛍光が減少する核酸プローブであって、配列番号1に示す塩基配列において塩基番号183から始まる8～30塩基長の塩基配列を有し、5'末端が蛍光色素で標識され、または、配列番号2に示す塩基配列において塩基番号196で終わる7～30塩基長の塩基配列を有し、3'末端が蛍光色素で標識されている前記核酸プローブを含む、請求項3記載の方法のためのキット。
8. 核酸プローブが、配列番号8～12に示す塩基配列のいずれかを有する請求項7記載のキット。
9. β_3 アドレナリン受容体をコードする核酸における、 β_3 アドレナリン受

容体のアミノ酸配列の64位のトリプトファンがアルギニンに置換する変異をもたらす塩基配列の変異を含む領域を、DNAポリメラーゼを用いる方法で増幅するためのプライマーをさらに含む請求項7または8記載のキット。

1/6

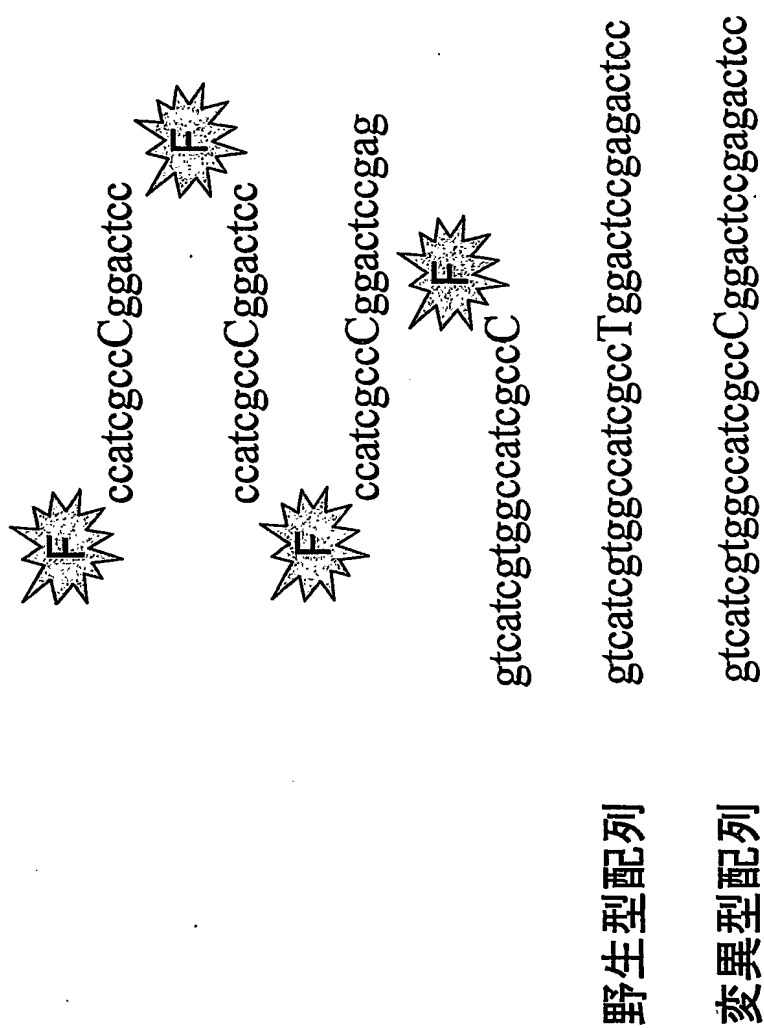


図1

2/6

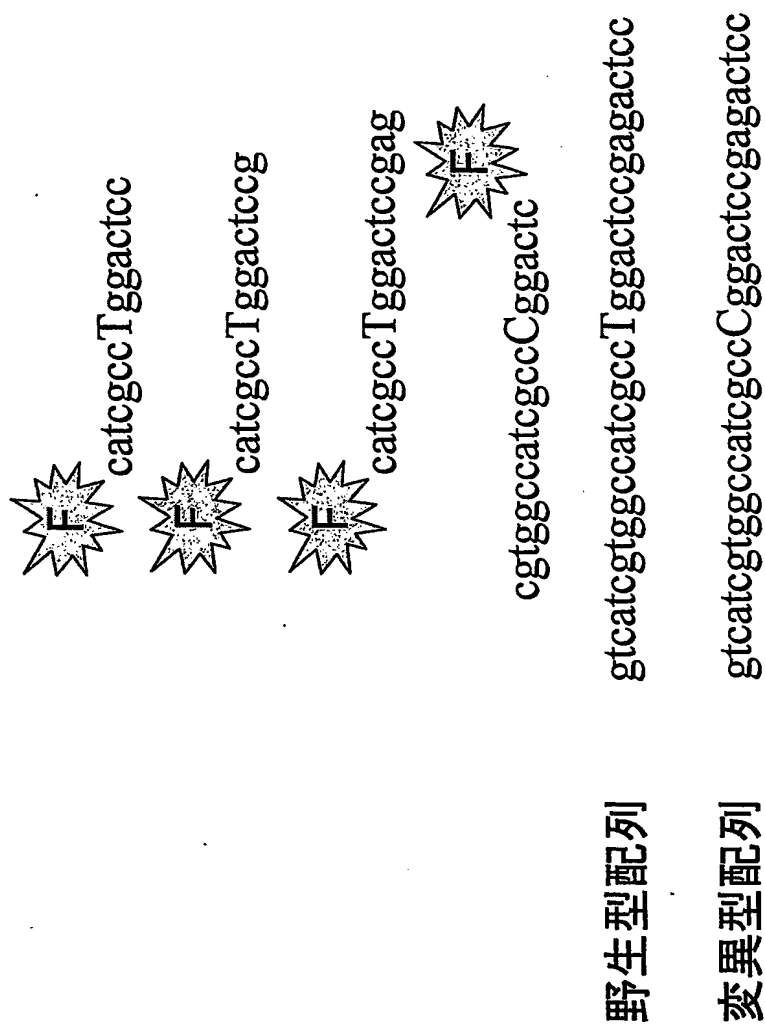


図2

3/6

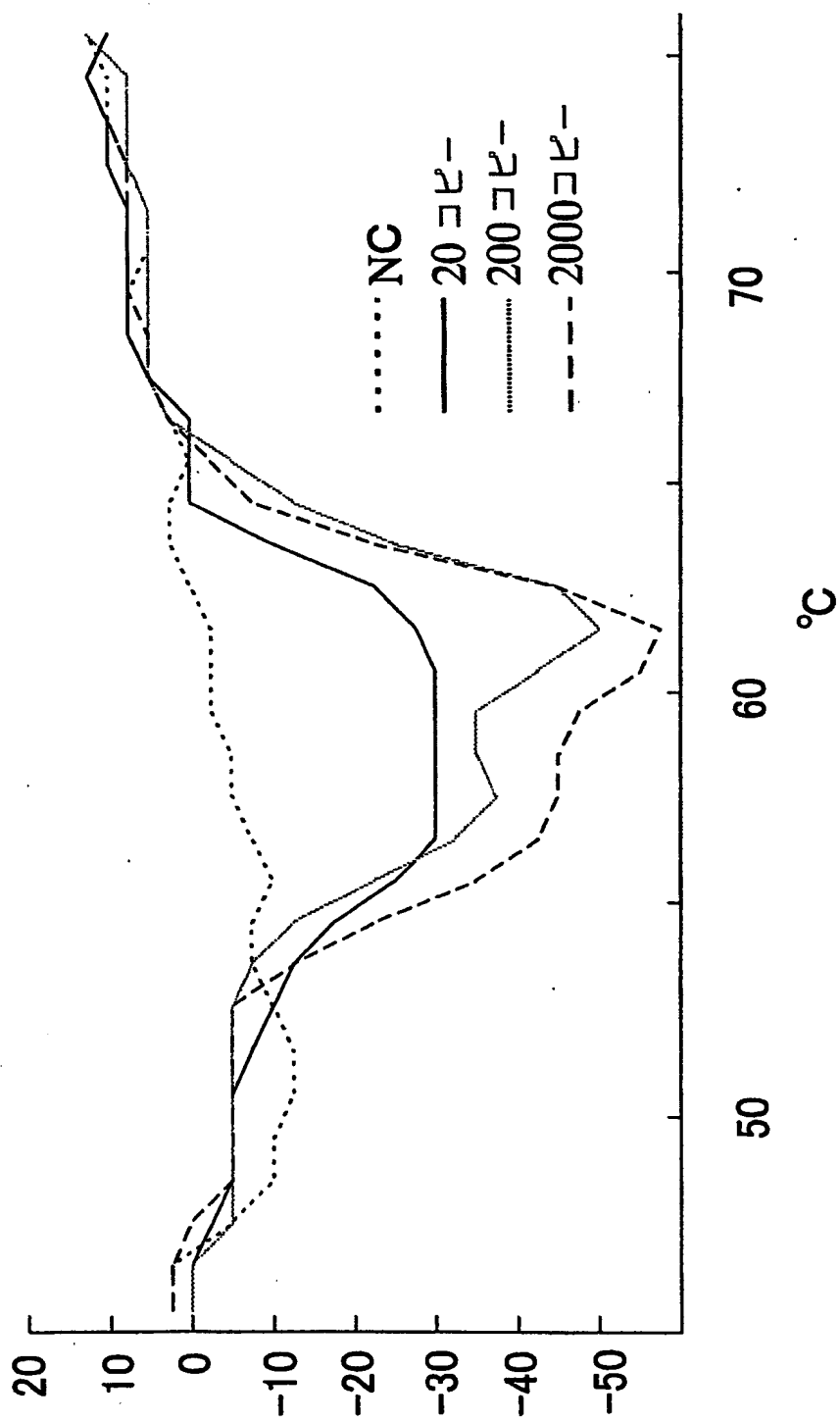


図 3

4/6

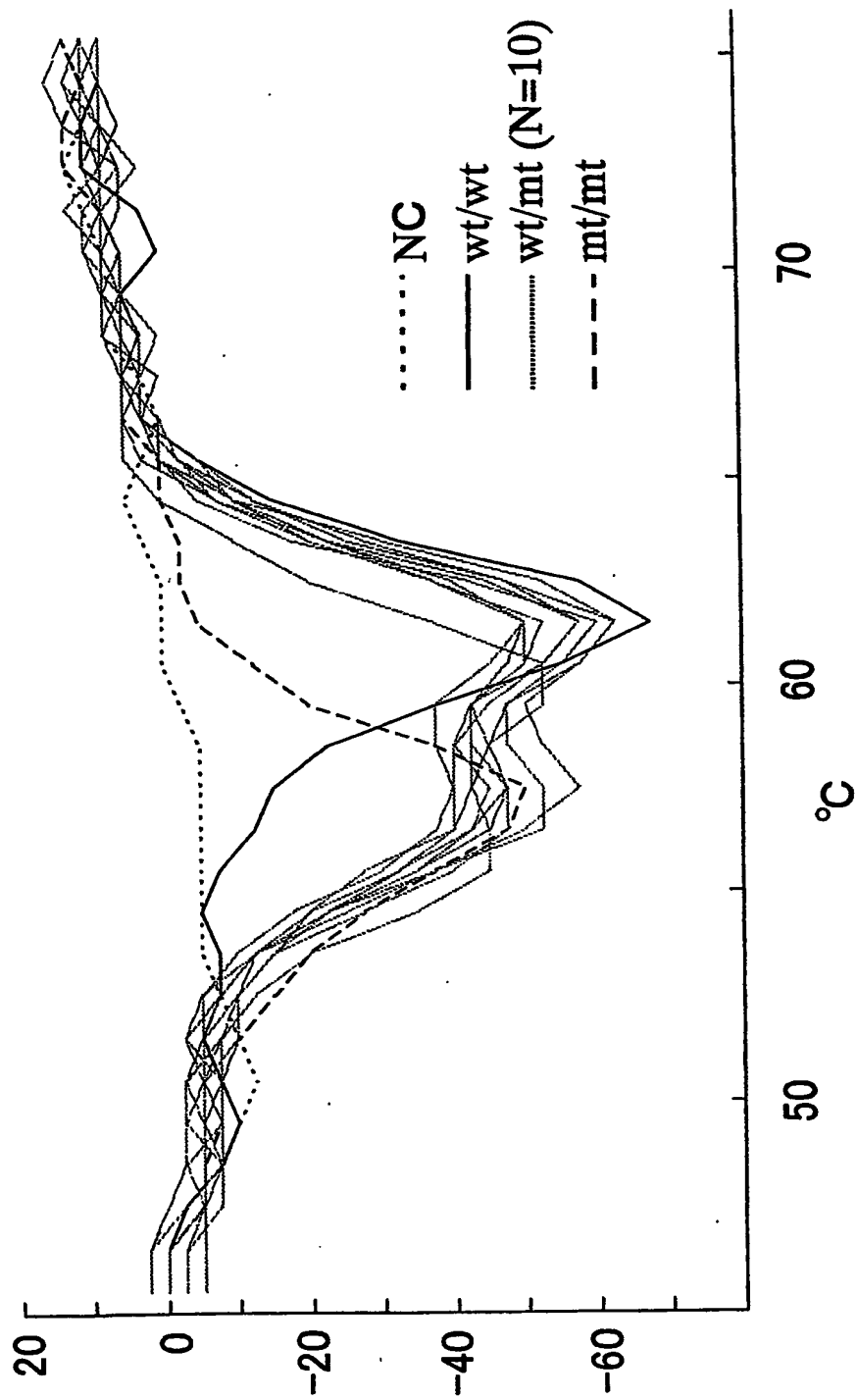


図 4

5/6

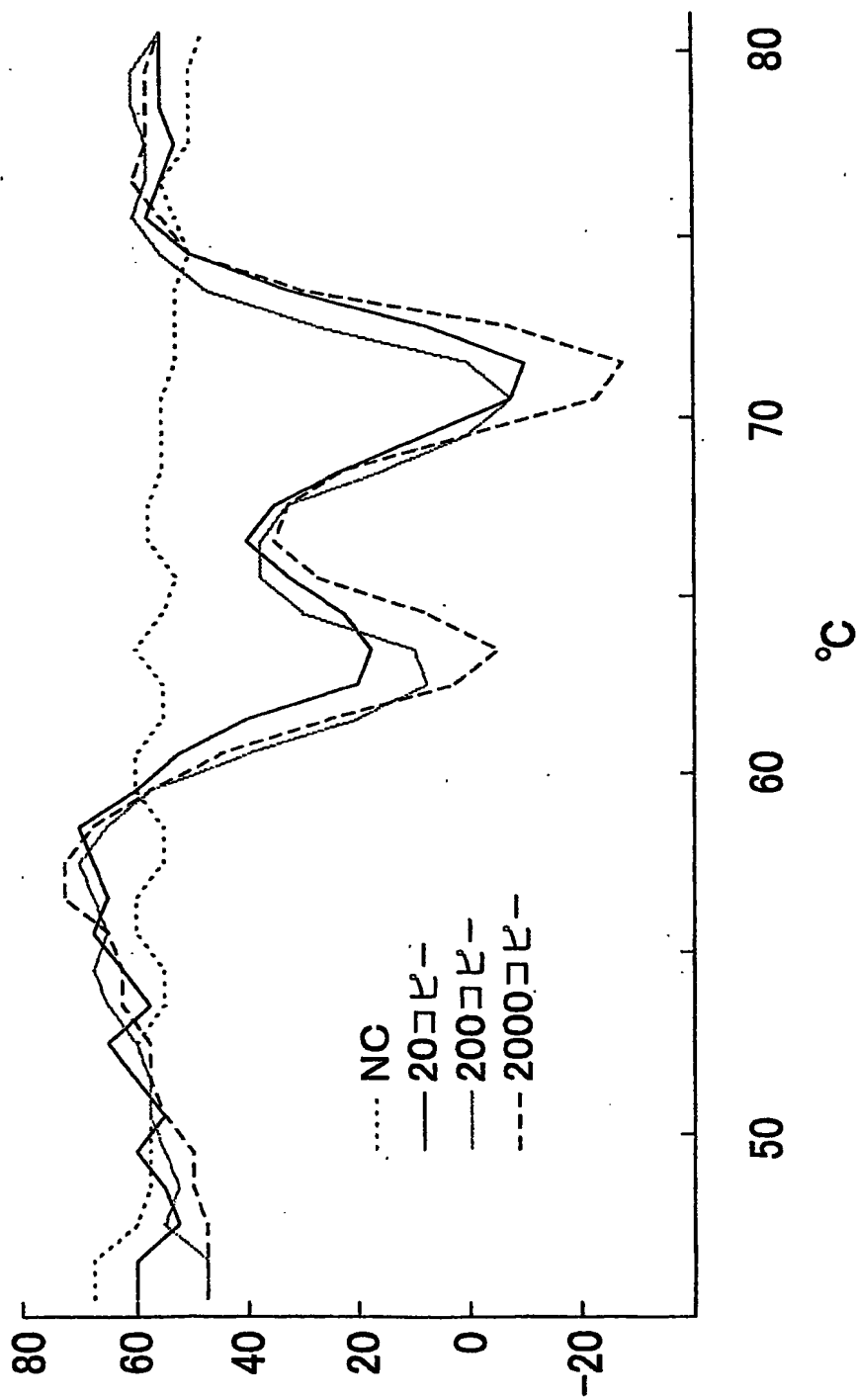


図 5

6/6

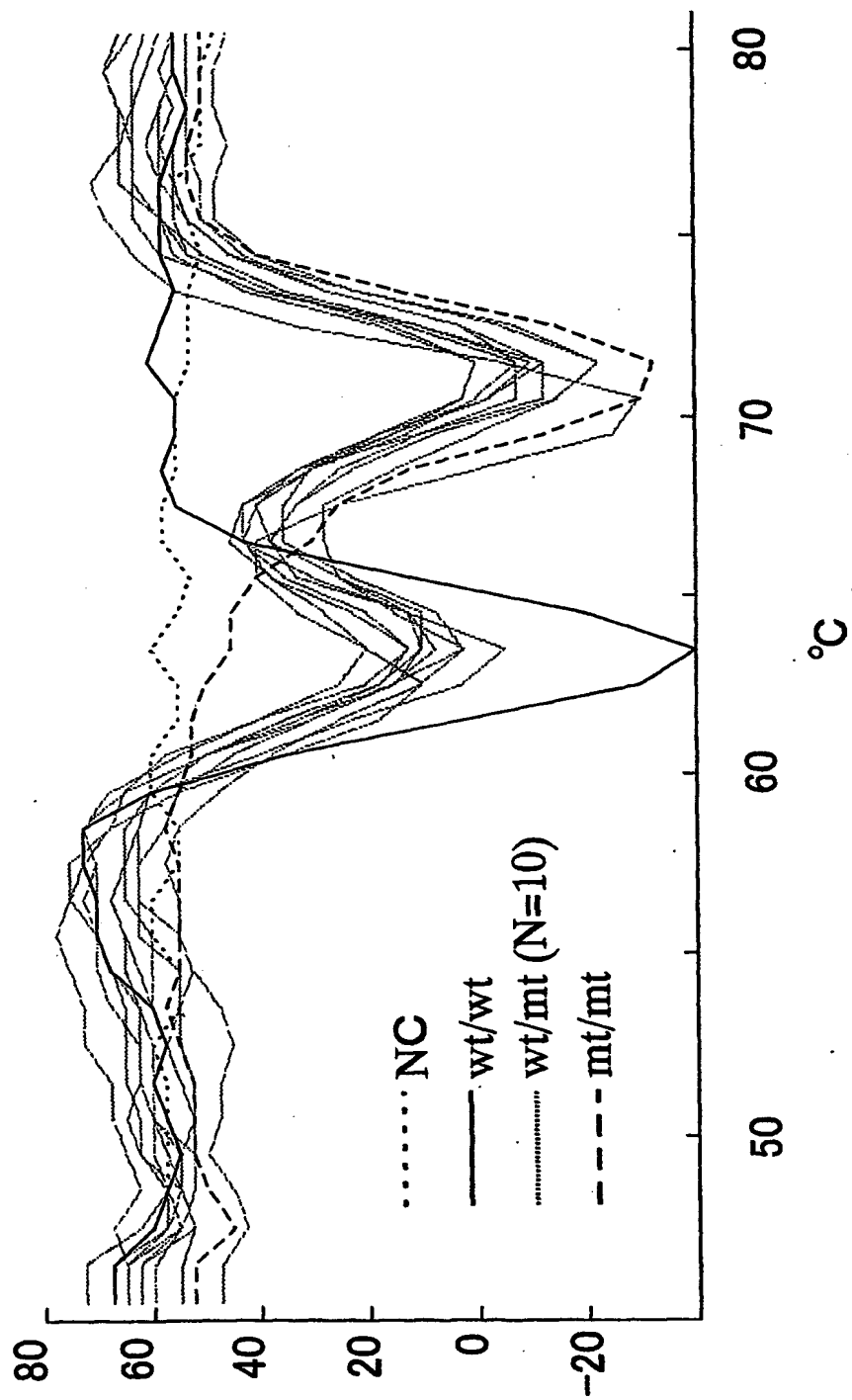


図 6

1/5

Sequence Listing

<110> アークレイ株式会社 (Arkray, Inc.)

<120> β 3 アドレナリン受容体変異遺伝子の検出法ならびにそのための核酸プローブおよびキット

<130> G867-OPC4054

<150> JP 2003-114381

<151> 2003-04-18

<160> 12

<210> 1

<211> 1227

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> allele

<222> 190

<400> 1

| | | | | | | |
|------------|-------------|-------------|------------|------------|------------|------|
| atggctccgt | ggcctcacga | gaacagctct | cttgccccat | ggccggacct | ccccaccctg | 60 |
| gcgccaata | ccgccaacac | cagtgggctg | ccaggggttc | cgtgggaggc | ggccctagcc | 120 |
| ggggccctgc | tggcgctggc | ggtgctggcc | accgtgggag | gcaacctgct | ggtcatcgtg | 180 |
| gccatgcct | ggactccgag | actccagacc | atgaccaacg | tgttcgtgac | ttcgctggcc | 240 |
| gcagccgacc | tggatgatggg | actcctgggtg | gtgccgcggg | cggccacctt | ggcgctgact | 300 |
| ggccactggc | cgttgggcgc | cactggctgc | gagctgtgga | cctcgggtga | cgtgctgtgt | 360 |
| gtgaccgcca | gcacgaaaac | cctgtgcgcc | ctggccgtgg | accgctacct | ggctgtgacc | 420 |
| aaccgcgtgc | gttacggcgc | actggtcacc | aagcgctgcg | cccggacagc | tgtggtcctg | 480 |
| gtgtgggtcg | tgtcggccgc | ggtgtcgttt | gcgcccata | tgagccagt | gtggcgcgta | 540 |
| ggggccgacg | ccgagggcga | gcgctgccac | tccaaccgcg | gctgctgtgc | cttcgcctcc | 600 |
| aacatgccct | acgtgctgct | gtcctcctcc | gtctccttct | accttcctct | tctcgtgatg | 660 |
| ctcttcgtct | acgcgcgggt | tttcgtggtg | gctacgcgcc | agctgcgctt | gctgcgcggg | 720 |
| gagctgggcc | gctttccgcc | cgaggagtct | ccgcgggcgc | cgtcgcgctc | tctggccccg | 780 |
| gccccggtgg | ggacgtgcgc | tccgcccga | gggggtgccc | cctgcggccg | gcggccccgc | 840 |
| cgctcctgc | ctctccggga | acaccgggcc | ctgtgcacct | tgggtctcat | catgggcacc | 900 |
| ttactctct | gctggttgcc | cttctttctg | gccaacgtgc | tgcgcgccct | ggggggcccc | 960 |
| tctctagtc | cgggccccgc | tttcttgcc | ctgaactggc | taggttatgc | caattctgcc | 1020 |
| ttcaaccgc | tcatctactg | ccgcagcccg | gactttcgca | gcgccttccg | ccgtcttctg | 1080 |
| tgccgtgcg | gccgtgcct | gcctccggag | ccctgcgcgc | ccgcccgcgc | ggccctcttc | 1140 |

2/5

ccctcgggcg ttctgcggc ccggagcagc ccagcgcagc ccaggctttg ccaacggctc 1200
gacggggctt cttggggagt ttcttag 1227

<210> 2
<211> 1227
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> allele
<222> 190

<400> 2
atggctccgt ggccctcacga gaacagctct cttgccccat ggccggacct cccacacctg 60
gcgccaata ccgccaacac cagtgggctg ccaggggttc cgtgggaggc ggccctagcc 120
ggggccctgc tggcgctggc ggtgctggcc accgtgggag gcaacctgct ggtcatcgtg 180
gccatcgccc ggactccgag actccagacc atgaccaacg tgttcgtgac ttcgctggcc 240
gcagccgacc tggatgatggg actcctggtg gtgccgccgg cggccacctt ggcgctgact 300
ggccactggc cgttggggcg cactggctgc gagctgtgga cctcgggtga cgtgctgtgt 360
gtgaccgcca gcatcgaaac cctgtgcgcc ctggccgtgg accgctacct ggctgtgacc 420
aaccgcgtgc gttacggcg cactggtcacc aagcgctgcg cccggacagc tgtggctcctg 480
gtgtgggtcg tgtcgccgc ggtgtcgtt gcgccccatca tgagccagtg gtggcgcgta 540
ggggccgacg ccgagggcgca gcgctgccac tccaaccgcg gctgctgtgc cttgcctcc 600
aacatgccct acgtgctgct gtcctcctcc gtctccttct accttctct tctcgtgatg 660
ctcttcgtct acgcgcgggt tttcgtggtg gctacgcgcc agctgcgctt gctgcgcggg 720
gagctgggccc gctttccgcc cgaggagtct ccgccggcgc cgtcgcgctc tctggccccg 780
gccccggtgg ggacgtgcgc tccgcccgaa ggggtgcccg cctgcggccg gcggcccgcg 840
cgctcctgc ctctccggga acaccgggccc ctgtgcacct tgggtctcat catgggcacc 900
ttactctct gctggttgcc cttctttctg gccaacgtgc tgcgcgccct ggggggcccc 960
tctctagtc cgggcccggc ttctcttgcc ctgaactggc taggttatgc caattctgcc 1020
ttcaaccgc tcatctactg ccgcagcccg gactttcgca gcgccttccg ccgtcttctg 1080
tgccgctgc gccgtgcct gcctccggag cctgcgccg ccgccgccc ggccctcttc 1140
ccctcgggcg ttctgcggc ccggagcagc ccagcgcagc ccaggctttg ccaacggctc 1200
gacggggctt cttggggagt ttcttag 1227

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

| | |
|---------------------------|----|
| <400> 3 | |
| gccagcgaag tcacgaacac | 20 |
| <210> 4 | |
| <211> 14 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220> | |
| <223> primer | |
| <400> 4 | |
| ggcgctggcg gtgc | 14 |
| <210> 5 | |
| <211> 16 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220> | |
| <223> probe | |
| <400> 5 | |
| ccatcgcccg gactcc | 16 |
| <210> 6 | |
| <211> 19 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220> | |
| <223> probe | |
| <400> 6 | |
| ccatcgcccg gactccgag | 19 |
| <210> 7 | |
| <211> 19 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220> | |
| <223> probe | |

<400> 7
gtcatcgtgg ccatcgccc 19

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 8
cgtggccatc gcccgactc 20

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 9
catcgctgg actccgagac 20

<210> 10
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> probe

<400> 10
catcgctgg actccgag 18

<210> 11
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

5/5

<223> probe

<400> 11

catcgccctgg actccg

16

<210> 12

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 12

catcgccctgg actcc

15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005525

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/12, C12Q1/68, G01N21/78, G01N33/53, G01N33/566,
G01N33/58

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/12, C12Q1/68, G01N21/78, G01N33/53, G01N33/566,
G01N33/58

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus (JOIS), SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
BIOSIS/WPI (DIALOG), CA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| Y | JP 2002-034598 A (Toyobo Co., Ltd.), 05 February, 2002 (05.02.02), Seq. 7-8 (Family: none) | 1-9 |
| Y | WO 96/36641 A1 (The Johns Hopkins University School of Medicine), 21 November, 1996 (21.11.96), (Family: none) | 1-9 |
| Y | JP 2002-119291 A (Japan Bioindustry Association et al.), 23 April, 2002 (23.04.02), Full text & WO 2002/08414 A1 & EP 1295941 A1 | 1-9 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
01 June, 2004 (01.06.04)

Date of mailing of the international search report
15 June, 2004 (15.06.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005525

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| Y | Loeffler J. et al., Rapid detection of point mutations by fluorescence resonance energy transfer and probe melting curves in Candida species, Clin.Chem., 2000, Vol.46, No.5, pages 631-5 | 1-9 |
| A | WO 94/02590 A1 (Wayne State University), 03 February, 1994 (03.02.94), Fig. 1 & US 5364772 A | 1-9 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/005525

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material

☒

a sequence listing

☐

table(s) related to the sequence listing

b. format of material

☐

in written format

☒

in computer readable form

c. time of filing/furnishing

☐

contained in the international application as filed

☒

filed together with the international application in computer readable form

☐

furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ C12N15/12, C12Q1/68, G01N21/78, G01N33/53, G01N33/566, G01N33/58

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ C12N15/12, C12Q1/68, G01N21/78, G01N33/53, G01N33/566, G01N33/58

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus(JOIS) SwissProt/PIR/GeneSeq Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq BIOSIS/WPI(DIALOG) CA(STN)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| Y | JP 2002-034598 A (東洋紡績株式会社) 2002.02.05, seq.7-8 (ファミリーなし) | 1-9 |
| Y | WO 96/36641 A1 (The Johns Hopkins University School of Medicine) 1996.11.21 (ファミリーなし) | 1-9 |
| Y | JP 2002-119291 A (財団法人バイオインダストリー協会 他) 2002.04.23, 全文 & WO 2002/08414 A1 & EP 1295941 A1 | 1-9 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01.06.2004

国際調査報告の発送日

15.6.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子

4N

3126

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|---|------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| Y | Loeffler J. et al., Rapid detection of point mutations by fluorescence resonance energy transfer and probe melting curves in Candida species, Clin. Chem., 2000, Vol.46, No.5, pages 631-5 | 1-9 |
| A | WO 94/02590 A1 (Wayne State University) 1994.02.03, Fig.1 & US 5364772 A | 1-9 |

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列 (第 1 ページの 1. b の続き)

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ

☒ 配列表

☐ 配列表に関連するテーブル

b. フォーマット

☐ 書面

☒ コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期

☐ 出願時の国際出願に含まれる

☒ この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2. ☒ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見: